

共刺激因子B7-H1蛋白在胆囊癌中的表达及与预后的关系



展鹏远, 王晓磊, 郭伟, 段文飞, 邢燕来, 吴飞

Expression of Costimulator B7-H1 Protein in Gallbladder Carcinoma Tissues and Its Relationship with Prognosis

ZHAN Pengyuan, WANG Xiaolei, GUO Wei, DUAN Wenfei, XING Yanlai, WU Fei

Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of He'nan University, Kaifeng 475001, China

Corresponding Author: WANG Xiaolei, E-mail: hdyfywxl@126.com

Abstract: Objective To investigate the expression of B7-H1 protein in gallbladder carcinoma tissues and to explore its role in the carcinogenesis and progression of gallbladder carcinoma. **Methods** The expression of B7-H1 protein in 60 cases of gallbladder carcinoma tissues were detected by immunohistochemistry(SP) method; 20 cases of corresponding non-tumor tissues and 20 cases of gallbladder adenoma polyp were served as control groups. **Results** The expression of B7-H1 protein in gallbladder carcinoma group was significantly higher than that in corresponding non-tumor tissues group($P=0.003$) and gallbladder adenoma polyp group($P=0.035$); the B7-H1 protein expression levels in Nevin(IV+V) stage, TNM(III+IV) stage and lymph node metastasis group were significantly higher than those in Nevin(I+II+III) stage ($P=0.041$), TNM(I+II) stage($P=0.049$) and lymph node metastasis-free group($P=0.000$); but the expression of B7-H1 protein had no relationship with age, gender or tumor differentiation($P>0.05$). The three-year survival time of the patients with positive expression of B7-H1 protein was significant lower than those with negative expression of B7-H1 protein($P=0.029$). **Conclusion** The overexpression of B7-H1 protein results in poor prognosis, indicating that B7-H1 protein plays role in the development, invasion and metastasis of gallbladder carcinoma.

Key words: B7-H1 protein; Gallbladder carcinoma; Immunohistochemistry; Prognosis

摘要: 目的 观察B7-H1蛋白在胆囊癌中的表达; 探讨其在胆囊癌的发生发展中的作用及其与预后的关系。 **方法** 用免疫组织化学SP法检测B7-H1蛋白在60例胆囊癌组织中的表达; 另取癌旁非肿瘤组织20例及胆囊腺瘤性息肉20例作为对照组。 **结果** 胆囊癌组中B7-H1蛋白的表达明显高于癌旁非肿瘤组织组($P=0.003$)和胆囊腺瘤性息肉组($P=0.035$); B7-H1蛋白在Nevin(IV+V)期、TNM(III+IV)期、有淋巴结转移组中的表达明显高于Nevin(I+II+III)期($P=0.041$)、TNM(I+II)期($P=0.049$)、无淋巴结转移组($P=0.000$); 与性别、年龄及肿瘤分化程度无关($P>0.05$)。B7-H1蛋白阳性表达组的三年生存期明显短于阴性表达者($P=0.029$)。 **结论** B7-H1蛋白在胆囊癌中高表达导致预后不良, 提示B7-H1蛋白在胆囊癌的发生发展和浸润转移中起作用。

关键词: B7-H1蛋白; 胆囊癌; 免疫组织化学; 预后

中图分类号: R735.8 **文献标识码:** A

0 引言

胆囊癌的恶性程度高, 预后差。研究胆囊癌发生发展的相关因子, 对于揭示其本质, 探索新的抗肿瘤途径具有十分重要的意义。现有的研究表明^[1], 多种基因相互作用及其调控蛋白的差异表达在恶性肿瘤发生、发展及侵袭转移中起作用; 其中就包括B7-H1。本研究应用免疫组织化学SP法检测B7-H1蛋白在60例胆囊癌组织中的表达; 探讨B7-H1蛋白在胆

囊癌组织中的表达规律及其可能预示的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集河南大学第一附属医院2004年6月至2011年1月期间手术切除的胆囊癌标本60例, 所有的患者术前均未接受放、化疗, 术后病理诊断为胆囊癌。所取标本均经10%甲醛固定, 石蜡包埋。其中男15例、女45例; 年龄 >50 岁40例、 ≤ 50 岁20例; TNM I期12例、II期38例、III期8例、IV期2例; 伴淋巴结转移者26例、无淋巴结转移者34例; 高分化10例、中分化32例、低分化18例。对所有患者进行电话或书信随访, 全部患者生存时间以确诊时间为起点,

收稿日期: 2014-12-05; 修回日期: 2015-06-11

基金项目: 开封市科技发展计划项目(130351)

作者单位: 475001开封, 河南大学第一附属医院普外科

通信作者: 王晓磊, E-mail: hdyfywxl@126.com

作者简介: 展鹏远(1966-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事肝胆胰疾病的基础与临床研究

至患者死亡或最近一次随访时间生存为终点,无失访患者;随访时间截止至2014年1月31日。取癌旁非肿瘤组织20例及胆囊腺瘤性息肉20例作为对照。

1.2 主要试剂

人B7-H1别藻蓝蛋白单克隆抗体(克隆185504),鼠IgG1单克隆抗体均购自美国R&D公司。超敏SP(通用型)试剂盒:生物素标记的羊抗鼠IgG、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶购自福州迈新生物技术开发有限公司,产品编号:KIT-9701。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学检测 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP法);所用的载玻片用10%稀硝酸及AEPS液处理;一抗为B7-H1(1:100稀释);二抗为生物素化IgG;操作步骤按说明书进行;以结肠癌作为阳性对照,以磷酸盐缓冲盐水(PBS液)代替一抗作阴性空白对照。

1.3.2 结果判定方法 以细胞质及细胞膜中出现棕黄色颗粒状物为阳性染色,在高倍镜下($\times 400$),随机观察4个不连续视野,计算阳性细胞占细胞总数百分比,结合阳性细胞表达强度进行评分^[2],评分计算公式如下: $S = \sum ei$ 。其中S为评分最后得分;e为阳性细胞百分比评分:无阳性细胞为0分, $\geq 1\% \sim 30\%$ 为1分, $30\% \sim 60\%$ 为2分, $> 60\% \sim 100\%$ 为3分;i为阳性细胞表达强度评分,用分析测量图像软件Image Pro Plus 6.0系统对图像进行扫描,根据累计吸光度值(OD)评分:OD ≤ 15 计0分, $> 15 \sim 45$ 计1分, $> 45 \sim 75$ 计2分, ≥ 75 计3分; $S \geq 3$ 分为阳性表达。

1.4 统计学方法

应用SPSS17.0软件进行统计学处理,计数资料采用 χ^2 检验;连续性校正 χ^2 检验;生存分析采用Kaplan-Meier方法;预后影响因素的单因素分析采用Log rank检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H1在各组中的表达

免疫组织化学结果显示,B7-H1蛋白主要表

达于细胞质,也可表达于细胞膜,见图1。B7-H1蛋白在胆囊癌组中的表达高于胆囊腺瘤性息肉组($P=0.035$)和癌旁非肿瘤组织组($P=0.003$),差异有统计学意义,见表1。

表1 B7-H1蛋白在胆囊癌、癌旁非肿瘤组织和胆囊腺瘤性息肉中的表达

Table1 Expression of B7-H1 protein in gallbladder carcinoma, corresponding non-tumor tissues and gallbladder adenoma polyp tissues

Groups	B7-H1 protein			P
	Positive (n)	Negative (n)	Positive rate(%)	
Gallbladder carcinoma	28	32	46.7	0.035
Gallbladder adenoma polyp	4	16	20.0	
Corresponding non-tumor tissues	2	18	10.0	0.003

2.2 B7-H1蛋白与胆囊癌临床病理的关系

胆囊癌组织中B7-H1蛋白的阳性表达在Nevin(IV+V)期、TNM III+IV期、淋巴结转移组高于Nevin(I+II+III)期($P=0.041$)、TNM(I+II)期($P=0.049$)、无淋巴结转移组($P=0.000$),差异有统计学意义。与患者的性别($P=0.550$)、年龄($P=0.360$)、分化程度($P=0.366$)差异均无统计学意义,见表2。

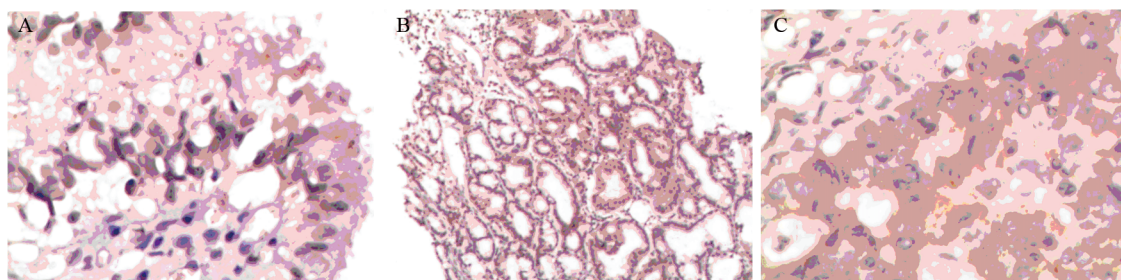
2.3 生存分析

Kaplan-Meier生存分析显示,B7-H1蛋白阳性表达组的中位生存期为21.00月,95%CI(17.54~24.58月);B7-H1蛋白阴性表达组的中位生存期为30.00月,95%CI(21.13~38.87月)。Log rank检验显示:B7-H1蛋白阳性表达患者三年生存期显著短于阴性表达患者($\chi^2=4.767$, $P=0.029$),见图2。

3 讨论

B7-H1(B7-homolog1)是B7家族中的共刺激信号分子之一,又称程序性死亡分子1配体1(PD-L1),是近年来发现的B7家族新成员,不同于其他B7家族分子的是它具有负向调节免疫应答的作用;在多种肿瘤细胞上高表达^[3]。

本研究显示,B7-H1蛋白在癌旁非肿瘤黏膜、



A: Positive expression of B7-H1 protein in corresponding non-tumor tissues(SP $\times 400$); B: Positive expression of B7-H1 in gallbladder adenoma polyp tissues(SP $\times 200$); C: Positive expression of B7-H1 in gallbladder carcinoma tissues(SP $\times 400$)

图1 B7-H1蛋白在不同组织中的阳性表达

Figure1 Positive expression of B7-H1 protein in various tissues

表2 B7-H1蛋白的表达与胆囊癌临床病理特征的关系
Table2 Relationship between B7-H1 protein expression and clinicopathological indicators of gallbladder carcinoma patients

Clinicopathological indicator	n	B7-H1 protein			χ^2	P
		Posi- tive(n)	Nega- tive(n)	Positive rate(%)		
Nevin stage						
I + II + III	32	11	21	34.38	4.16	0.041
IV + V	28	17	11	60.71		
Lymph node metastasis						
With	34	9	25	26.47	12.86	0.000
Without	26	19	7	73.08		
TNM stage						
I + II	50	20	30	40.00	3.87*	0.049
III + IV	10	8	2	80.00		
Differentiation degree						
Poor	18	10	8	55.56	0.82	0.366
Well+moderate	42	18	24	42.86		
Gender						
Male	15	8	7	53.33	0.36	0.550
Female	45	20	25	44.44		
Age(years)						
≤ 50	20	11	9	55.00	0.84	0.360
> 50	40	17	23	42.50		

Notes: *: continuity correction chi-square test

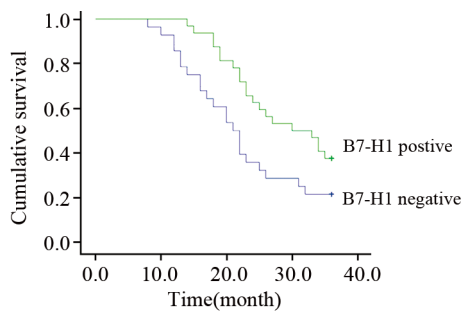


图2 胆囊癌中B7-H1阳性表达组和阴性表达组的Kaplan-Meier生存曲线
Figure2 Kaplan-Meier survival curves of positive and negative expression of B7-H1 protein in gallbladder carcinoma tissues

胆囊腺瘤性息肉及胆囊癌组织中均有表达；呈上升趋势，且胆囊癌组的表达高于癌旁非肿瘤黏膜组和胆囊腺瘤性息肉组，差异有统计学意义，提示B7-H1蛋白可能参与胆囊癌的发生。有研究报道^[4]，B7-H1可结合T细胞表面表达的受体PD-1分子，传递抑制性信号，抑制T细胞功能，介导肿瘤免疫逃逸，可逃避T淋巴细胞的免疫监视作用；还可调节外周组织中T细胞耐受，有利于肿瘤细胞生长。还有研究发现^[5]，B7-H1能下调E-cadherin表达，上调转录因子Twist、Slug表达，促进上皮细胞-间质转化，促进皮肤癌的发生。

有研究显示^[6]，趋化因子CXCR4在众多肿瘤中高表达，通过与其受体CXCL12结合参与肿瘤的浸润和淋巴结转移；研究发现^[7]共刺激因子B7-H1与CXCR4在膀胱移行细胞癌组织高表达且二者呈正

相关，与膀胱移行细胞癌的临床分期、病理分级、复发等相关；认为两者在膀胱移行细胞癌的发展过程中起作用。还有研究发现^[8]：B7-H1在结肠癌转移的淋巴结中高表达；B7-H1的受体PD-1在淋巴结中特异性高表达，认为B7-H1抑制淋巴细胞的增殖分化、免疫应答、促进淋巴细胞凋亡，有利于肿瘤细胞转移。此外，Parsa等^[1]发现PTEN具有抑癌作用；可以逆转PI3K所催化的反应，负向调节PI3K/Akt通路，当它发生突变或缺失时，PI3K/Akt通路活性增强，参与基因转录、蛋白质翻译起始、细胞凋亡等多项细胞功能。而B7-H1蛋白在Akt激活时表达增多，所以PTEN的缺失或突变可通过激活Akt而致B7-H1蛋白表达的增加；参与肿瘤的浸润及转移。这些结果提示B7-H1在肿瘤细胞的异常表达与肿瘤进展有一定的关系；B7-H1也可能通过以上机制参与胆囊癌的发展。

结合患者生存分析发现，B7-H1蛋白在胆囊癌中的表达水平与患者的预后呈负相关性，B7-H1蛋白在胆囊癌中的表达有可能成为胆囊癌预后判断的指标之一。此外，B7-H1在免疫及基因治疗方面已有相关的研究报道^[9]，这为胆囊癌的干预治疗也提供了一个新的思路。

参考文献：

[1] Parsa AT, Waldron JS, Panner A, *et al.* Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma[J]. Nat Med, 2007, 13(1): 84-8.
[2] Maréchal R, Demetter P, Nagy N, *et al.* High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma[J]. Br J Cancer, 2009, 100 (9): 1444-51.
[3] Dong H, Zhu G, Tamada K. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion[J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1365-9.
[4] Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion[J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(5): 739-45.
[5] Cao Y, Zhang L, Kamimura Y, *et al.* B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin[J]. Cancer Res, 2011, 71(4): 1235-43.
[6] Dai X, Mao Z, Huang J, *et al.* The CXCL12/CXCR4 autocrine loop increases the metastatic potential of non-small cell lung cancer in vitro[J]. Oncol Lett, 2013, 5(1): 277-82.
[7] Gong XH, Wang YH, Shao SX, *et al.* Expression and significance of B7-H1 and CXCR4 in bladder transitional cell carcinoma[J]. Qilu Yi Xue Za Zhi, 2013, 8(4): 286-8. [公欣海, 王永华, 邵世修, 等. 膀胱移行细胞癌组织B7-H1和CXCR4表达及其意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2013, 8(4): 286-8.]
[8] Liu SM, Liu GH, Zhang QX, *et al.* Expression of B7-H1 and its significance in colon cancer[J]. Shi Jie Hua Ren Xiao Hua Za Zhi, 2009, 17(8): 841-3. [刘书漫, 刘国红, 张钦宪, 等. B7-H1在结肠癌组织中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(8): 841-3.]
[9] Pilon-Thomas S, Mackay A, Vohra N, *et al.* Blockade of programmed death ligand 1 enhances the therapeutic efficacy of combination immunotherapy against melanoma[J]. J Immunol, 2010, 184(7): 3442-9.

[编辑：黄国玲；校对：安凤]